

(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl. 7
 C07D 309/12

(11) 공개번호 10-2004-0042338
 (43) 공개일자 2004년05월20일

(21) 출원번호 10-2002-0070591
 (22) 출원일자 2002년11월14일

(71) 출원인 백용기
 서울 서초구 잠원동 65-32 신반포7차아파트 303-809

(주)케이디알
 서울 강동구 암사동 506-4

(72) 발명자 정판영
 서울특별시 강동구 성내동 미주아파트 2동 705호

백용기
 서울 서초구 잠원동 65-32 신반포7차아파트 303-809

(74) 대리인 박종만

심사청구 : 있음

(54) 약학적으로 유용한 노화 및 스트레스 조절용 신규 페로몬 화합물 및 그 분리정제방법

요약

본 발명은 노화와 스트레스에 관련된 생리활성물질의 효과적인 분리정제와 그 구조 규명에 관한 것이다. 꼬마선충을 에스 베이살 액체 배지 상에서 대장균을 먹이로 하여 키운 후, 배지를 완전히 농축하여서 에탄올로 추출하는 단계; 상기 추출물을 물에 녹여서 에틸아세테이트로 재추출하는 단계; 실리카-겔 흡착 크로마토그래피를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 아민 잔기가 결합되어 있는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 용매의 조성변화를 이용한 분리 정제 단계; 그리고 분자량 크기를 이용한 고성능 액체 크로마토그래피 단계를 거쳐 완전 분리정제하는 단계를 포함하여 이루어지는 신규 페로몬의 분리정제 방법 및 그 방법에 의하여 얻어지는 페로몬을 제공한다. 본 발명의 페로몬은 생리활성물질에 의하여 유발되는 생체내 노화, 스트레스, 대사경로와 신호전달 체계 및 항암제 개발, 비만, 신경기관의 반응 그리고 이와 관련된 약물 개발연구에 많은 효과를 얻을 수 있다.

대표도

도 1

색인어

꼬마선충(C. elegans), 페로몬, 노화, 스트레스, 장기휴면유충(dauer larva)

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 꼬마선충으로부터 본 발명의 페로몬을 분리정제하는 방법을 단계적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 아이소-프로판을과 증류수를 용매로 하여 기울기 용리법을 실시한 아민 고성능 액체분배 크로마토그래피의 결과를 나타내는 그라프이다.

도 3은 메탄올을 용매로 하여 등용매 용리법을 실시한 분자량 크기별(W251) 고성능 액체분배 크로마토그래피의 결과를 나타내는 그라프이다.

도 4는 뉴트로메탄올(CD₃OD)을 용매로 하여 측정한 수소 핵자기 공명 스펙트럼(1H-NMR)의 그라프이다.

도 5는 뉴트로메탄올(CD₃OD)을 용매로 하여 측정한 탄소 핵자기 공명 스펙트럼(13C-NMR)의 그라프이다.

도 6은 쿼더러플 방식의 질량분석기를 이용하여 포지티브 모드로 질량을 측정한 결과를 나타내는 그라프이다.

도 7은 쿼더러플 방식의 질량분석기를 이용하여 포지티브 모드로 질량 측정시, 페로몬에 소디움아세테이트를 첨가한 후에 질량을 측정한 결과를 나타내는 그라프이다.

도 8은 쿼더러플 방식의 질량분석기를 이용하여 네거티브 모드로 질량을 측정한 결과를 나타내는 그라프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 노화와 스트레스에 관련된 생리활성물질의 효과적인 분리정제와 그 구조 규명에 관한 것이다.

생리활성물질로서 알려진 페로몬(pheromones)은 동물의 체내에서 생산되고 체외로 분비되어 동종 타개체에 작용하여 특정의 행동이나 생리적 변화를 일으키는 물질의 총칭이다.

이와 같은 페로몬 물질은 종래에는 단순한 유기용매 추출과 부분 정제로 페로몬 혼합추출물 형태로 얻어 사용하였으나, 불순물의 혼재로 인하여 생리활성물질로서의 페로몬의 정확한 구조와 기능을 연구할 수 없는 한계를 지니고 있었다.

지금까지 알려진 문헌을 통하여 보고된 바에 의하면, 꼬마선충 씨.엘레강스 (*C. elegans*)에서 분비되는 페로몬은 매우 적은 양으로 존재하며, 분자량이 1,000 달톤 이하이고, 매우 안정적이며, 비휘발성이고, 수산화되어 있는 짧은 지방산과 같은 크로마토그래피 성질을 가지는 단일물질 또는 이와 밀접한 복합물질로 알려져 있다(Riddle, D.L., Science, 218: 578-580, 1982).

상기 논문에서는 페로몬 성분을 두 단계의 컬럼크로마토그라피를 이용하여 부분 정제하였으나, 순수한 페로몬의 구조나 특성에 대한 더 이상의 정보는 밝히지 못하였다.

또한, 지금까지 연구자들이 사용해온 꼬마선충(*C. elegans*)의 페로몬 함유 추출물은 에탄올 추출물에 의한 혼합물이었기 때문에 페로몬에 의한 활성의 생체 내 정확한 작용위치와 작용기전 및 생리과정을 직접적으로 연구할 수 있는 방법이 없었다.

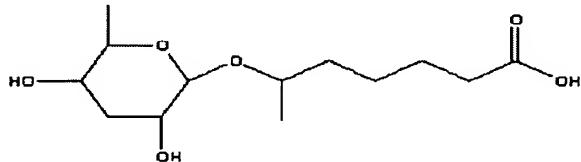
따라서, 본 발명은 꼬마선충을 스트레스나 생존환경 악화로 인하여 장기휴면유충기(dauer larva stage)를 유발할 수 있는 페로몬을 가장 많이 함유한 상태에서 대량 배양한 후, 이들이 발산하는 페로몬을 순수하게 분리정제하고 그 분리정제된 페로몬 유도체의 구조를 규명하기 위한 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 꼬마선충으로부터 분비되는 노화와 스트레스에 관련된 페로몬을 순수 분리정제하여 그 구조를 규명함으로써, 모델생물체의 노화, 스트레스, 신호전달체계, 대사조절 및 질병발생기전을 연구하기 위한 노화조절물질과 관련 수단을 함께 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고마선충(*C. elegans*)이 초기 배아 기, L1, L2, L3, L4와 성체기 등 6 주기에 걸쳐 일생을 살면서 생존환경이 나빠지거나 스트레스를 받을 때, 노화과정을 회피하기 위하여 장기휴면유충기로 진입하도록 유도하는 생리활성물질인 다음 화학식 I의 신규 페로몬 화합물, 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산 및 그 염을 제공한다.

화학식 1



본 발명의 상기 화학식 I 화합물은 고마선충으로부터 분리정제시 산 또는 그의 소디움염으로 분리할 수 있다. 또한 상기 화학식 I의 화합물은 분리후 염기와 반응하여 부가염을 형성할 수도 있다. 상기 염기로서는 약제학적으로 허용될 수 있는 알카리 및 알카리토금속염을 사용할 수 있다.

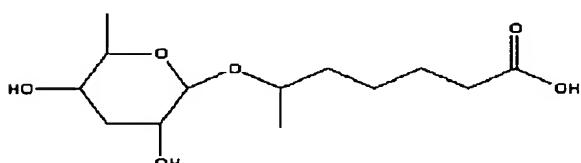
본 발명은 또한 고마선충으로부터 분비되는 상기 화학식 I의 신규 페로몬 화합물을 순수 분리정제하는 방법을 제공한다.

본 발명에 의한 상기 화학식 I의 신규 페로몬 화합물의 분리정제 방법은, 고마선충을 에스 베이살 (*S. basal*) 액체 배지 상에서 대장균을 먹이로 하여 키운 후, 배지를 완전히 농축하여서 에탄올로 추출하는 단계; 상기 추출물을 물에 녹여서 에틸아세테이트로 재추출하는 단계; 실리카-겔 흡착 크로마토그래피를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 아민잔기가 결합되어있는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 용매의 조성변화를 이용한 분리정제 단계; 그리고 분자량 크기를 이용한 고성능 액체 크로마토그래피 단계를 거쳐 완전 분리정제하는 단계를 포함하여 이루어진다.

발명의 구성 및 작용

본 발명에 의해 분리정제된 다음 화학식 I의 신규 페로몬 화합물 및 그 염은 고마선충이 분비하는 물질로서, 성장주기중 L2 후반부와 L3 전반부의 단계에서 장기휴면유충기를 유도하는 기능을 갖는다.

화학식 1



고마선충이 일단 휴면유충기에 들어가면 움직임이 없으며, 몸체가 가늘어지고, 인두의 펌핑작용이 중단되는 표현형 질을 띠게 되며, 생리적 대사과정이 전체적으로 감소되는 반면, 생체내 유해 대사를 극복할 수 있는 방어 대사만 상승한다고 알려져 있다.

지금까지 연구자들이 각종 노화와 스트레스 연구에서 사용했던 페로몬 함유 추출물은 꼬마선충을 배양하고 배지를 완전히 증발시킨 후, 단순히 에탄올로 추출한 미정제 추출물 상태이었다.

이에 비하여 본 발명은 최초로 순수한 상기 화학식 I의 신규 페로몬 화합물, 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산 및 그 소디움염을 분리정제하여 순수물질을 확보함으로써 그 이용과 작용을 명확히 연구할 수 있는 절차와 수단을 제공하였다.

이와 같이, 본 발명은 꼬마선충으로부터 스트레스와 노화과정을 회피하기 위하여 장기휴면유충기로의 진입을 유발시키는 상기 화학식 I의 페로몬 화합물을 분리정제하고, 분리정제된 페로몬 화합물의 구조를 규명하고, 그 생리활성 기능을 측정함으로써 선충류를 비롯한 실험동물의 노화와 이 물질의 생리적인 활성기능 및 약학적으로 유용한 효능을 연구하는데 널리 활용될 수 있다.

이하, 본 발명을 바람직한 실시예, 도면 및 표를 통하여 단계적으로 나누어 보다 구체적으로 설명한다. 여기에 기술된 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명은 이에 한정되지 않고 청구범위 및 발명의 특징에 의하여 다양한 변화가 가능하다.

실시예

에스 베이살(S basal) 액체 배지 상에서 대장균(OP50)을 먹이로 하여, 꼬마 선충을 20 °C에서 5일간 배양한 후, 대장균을 추가적으로 공급하여 10일 이상 배양하였다.

에스 베이살 액체 배지상에 존재하는 꼬마선충(*C. elegans*)의 개체수 증대에 따른 장기휴면유충기 형성이 70% 이상 유발된 후에 배양액을 얻기 위하여 원심분리를 실시한 후, 다시 0.45 μm의 막 필터를 이용하여 꼬마선충과 대장균을 완전히 제거하였다.

순수한 배양액을 대량 감압증발기를 이용하여 수분을 완전히 제거하여 분말 상태로 만든다.

분말 상태의 물질에 에탄올을 첨가하여 혼합물 상태의 페로몬을 추출하고, 이 과정을 3번 이상 반복한다.

꼬마선충(*C. elegans*)을 에스 베이살 액체 배지 상에서 대장균을 먹이로 하여 키운 후, 배지를 완전히 농축하고 에탄올로 추출한 후, 이 추출물이 정상적인 꼬마선충을 장기휴면유충기(dauer larva)로 유도하는지에 대한 생리활성을 측정한 결과를 표 1에 나타내었다.

추출된 혼합물 상태의 페로몬 분획을 완전히 감압 증발시킨 후, 증류수에 녹여서 동량의 에틸아세테이트로 5번 이상 추출한다.

표 2는 에탄올 추출물을 물에 녹인 후, 에틸아세테이트로 재추출하여 장기휴면유충기로 유도하는지에 대한 생리활성을 측정한 결과이다.

이렇게 하여 얻은 에틸아세테이트 분획을 다시 완전 증발시킨 후, 헥산:에틸아세테이트:메탄올을 7:7:1 비율로 혼합하여 실리카-겔 흡착 크로마토그래피 상에서 분획을 실시한다. 페로몬은 이러한 용매 조성에서 전개되지 않으므로, 이 단계에서 많은 불순물을 제거할 수 있다. 실리카-겔 흡착 크로마토그래피 상에서 흡착되어 있는 페로몬은 메탄올을 이용하여 용출시킨다.

표 3은 실리카-겔 흡착 크로마토그래피를 이용하여 불순물을 부분 제거후, 장기휴면유충기로 유도하는지에 대한 생리활성을 측정한 결과이다.

이렇게 얻은 부분 정제된 페로몬은 다시 증발시켜서 증류수와 메탄올에 용해한 다음, 아민잔기가 결합되어 있는 컬럼을 이용하여 고성능 액체분배 크로마토그래피를 실시한다.

용매 조성은 아이소-프로판올과 증류수를 1:1로 구성한 것으로, 이를 이용하여 기울기 용리법으로 분획을 실시한 후, 특정 분획에서 활성을 갖는 페로몬 분획을 얻는다.

표 4는 아이소-프로판올과 증류수를 용매로 기울기 용리법을 실시한 아민(NH₂) 고성능 액체분배 크로마토그래피의 시간에 따른 용매 조성이다.

또한 표 5는 아이소-프로판올과 증류수를 용매로 기울기 용리법을 실시한 아민(NH₂) 고성능 액체분배 크로마토그래피의 해당 분획이 장기휴면유충기로 유도하는지에 대한 생리활성을 측정한 결과이다.

상기에서 얻은 분획을 다시 메탄올을 이용하여 문자 크기에 따른 등용매 용리법을 이용한 고성능 액체분배 크로마토그래피를 실시하여 페로몬을 완전 분리정제한다.

표 6은 메탄올을 용매로 하여, 등용매 용리법을 실시한 분자량 크기별 (W251) 고성능 액체분배 크로마토그래피의 분획이 장기휴면유충기로 유도하는지에 대한 생리활성을 측정한 결과이다.

상기와 같은 분리정제 방법에 의하여 정제된 순수 페로몬은 상기 화학식 I 과 같은 구조로 규명되었으며, 그 일반식은 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산 또는 그 소디움염이다.

상기 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산은 분리후, 염기와 반응하여 부가 염을 형성할 수 있다. 상기 염기는 약제학적으로 허용될 수 있는 알카리 및 알카리토금속염, 예를 들어 소디움, 칼륨, 마그네슘, 또는 칼슘을 사용한다.

상기 페로몬, 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산의 순수 분자량은 276 달톤이고, 분자식은 $C_{13}H_{24}O_6$ 이다. 정제된 물질의 분자량은 생리활성을 나타내기 위하여 비공유결합에 의하여 연결되어 있는 1 분자의 소디움을 합하여 299 달톤이다. 이와 같은 분자량의 차이는 쿼더러플 방식의 텐덤 질량분석기를 이용하여 측정하였고, 이때 소디움아세테이트를 첨가하여 소디움 이온이 암모늄 이온으로 치환됨으로써 분리정제한 페로몬 화합물, 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산이 1 분자의 소디움 이온과 비공유결합되어 있음을 확인하였고, 네거티브 모드에서도 분자량이 276 달톤으로 재확인되었다.

상기 화학식 I 의 신규 페로몬의 구조를 규명하기 위하여, 수소 핵자기 공명 스펙트럼(1H-NMR)은 듀트로메탄올(CD3OD)을 용매로 하여 측정하였고, 탄소 핵자기 공명 스펙트럼(13C-NMR) 또한 듀트로메탄올(CD3OD)을 용매로 하여 측정하여서 결과를 얻었다.

케미컬 쉬프트는 피피엠(ppm)으로 주어졌다. 명백한 1H-와 13C-NMR 케미컬 쉬프트는 1H-1H DQF-COSY 스펙트럼, 13C-1H HMBC와 같은 다양한 2차원 NMR기술을 사용하여 얻었으며 그 결과는 표 7에 나타내었다. 표 7은 페로몬 [6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산]의 1H NMR(MHz), 13C NMR(MHz) 스펙트럼 분석 결과이다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 꼬마선충(*C. elegans*)으로부터 분비되는 신규 페로몬 화합물, 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산 및 그 염을 순수 분리정제하고 그 분자구조를 규명함으로써, 페로몬에 의하여 유발되는 생체내 노화, 스트레스, 대사경로와 신호전달 체계 및 항암제 개발, 비만, 신경기관의 반응 그리고 이와 관련된 약물 개발연구에 많은 효과를 얻을 수 있게 되었다.

[표 1]

	에탄올 추출물의 장기휴면유충기 형성 활성
장기휴면유충기 형성 %	100
장기휴면유충기 형성 개체수	173

[표 2]

	에틸아세테이트 분획물의 장기휴면유충기 형성 활성
장기휴면유충기 형성 %	100
장기휴면유충기 형성 개체수	194

[표 3]

	실리카-겔 흡착 컬럼 크로마토그라피를 이용해 용출한 분획의 장기휴면유충기 형성 활성
장기휴면유충기 형성 %	100
장기휴면유충기 형성 개체수	110

[표 4]

시간(분)	유속(ml/min)	아이소-프로판올(%)	증류수(%)
0	2	100	0
5	2	100	0
35	2	0	100
45	2	0	100

[표 5]

	아민 잔기가 결합되어 있는 컬럼 크로마토그라피에서 해당 분획의 장기휴면유충기 형성 활성
장기휴면유충기 형성 %	100
장기휴면유충기 형성 개체 수	92

[표 6]

	분자량 크기별(W251) 컬럼 크로마토그라피에서 해당 분획의 장기휴면유충기 형성 활성
장기휴면유충기 형성 %	100
장기휴면유충기 형성 개체 수	62

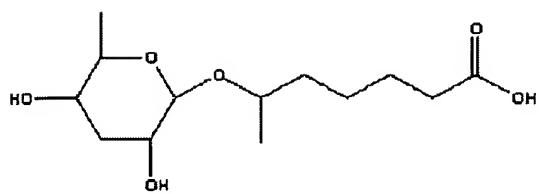
[표 7]

	Atom	DEPT	¹ H(ppm)	¹³ C(ppm)	DQF-COSY	HMBC(H->C)
Phero mone	1	COOH		177.299		C-2,3
	2	CH ₂	2.299	34.583	H-3	C-3
	3	CH ₂	1.644	25.415	H-2	C-2,4,5,6,7
	4	CH ₂	1.469	29.955	H-3,5	C-2,3,5
	5	CH ₂	1.500	37.121	H-6	C-3,4,6,7
			1.584			
	6	CH	3.808	71.331	H-5,7	C-5,7
	7	CH ₃	1.145	18.327	H-6	C-5
	2'	CH	4.663	96.559	H-3'	C-4'
	3'	CH	3.734	69.027	H-2'A'	C-2',4'
	4'	CH ₂	1.791	34.934	H-3',5'	C-2',5',6'
			1.974			
	5'	CH	3.548	67.445	H-4',6'	C-3',4',6',7'
	6'	CH	3.644	70.218	H-5',7'	C-4',5',7'
	7'	CH ₃	1.236	17.175	H-6'	C-5',6'

(57) 청구의 범위

청구항 1.

다음 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 또는 그 알카리 및 알카리토금속염

화학식 1**청구항 2.**

제1항에 있어서, 상기 페로몬 화합물이 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산인 것을 특정으로 하는 상기 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 및 그 알카리 및 알카리토금속염.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 염이 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산 소디움염인 것을 특징으로 하는 상기 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 및 그 알카리 및 알카리토금속염.

청구항 4.

제1항에 있어서, 6-(3,5-디하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-피란-2-일옥시)-헵타노익산을 알카리 및 알카리토금속 염기와 반응하여 부가염을 형성하는 것을 특징으로 하는 상기 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 및 그 알카리 및 알카리토금속염.

청구항 5.

제1항에 있어서, 꼬마선충을 에스 베이살 액체 배지 상에서 대장균을 먹이로 하여 키운 후, 배지를 완전히 농축하여서 에탄올로 추출하는 단계; 상기 추출물을 물에 녹여서 에틸아세테이트로 재추출하는 단계; 실리카-겔 흡착 크로마토그래피를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 아민 잔기가 결합되어 있는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 용매의 조성변화를 이용한 분리정제 단계; 그리고 분자량 크기를 이용한 고성능 액체 크로마토그래피 단계를 거쳐 완전 분리정제하는 단계를 포함하여 분리정제하는 것을 특징으로 하는 상기 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 및 그 알카리 및 알카리토금속염.

청구항 6.

꼬마선충을 에스 베이살 액체 배지 상에서 대장균을 먹이로 하여 키운 후, 배지를 완전히 농축하여서 에탄올로 추출하는 단계; 상기 추출물을 물에 녹여서 에틸아세테이트로 재추출하는 단계; 실리카-겔 흡착 크로마토그래피를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 아민 잔기가 결합되어 있는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 용매의 조성변화를 이용한 분리정제 단계; 그리고 분자량 크기를 이용한 고성능 액체 크로마토그래피 단계를 거쳐 완전 분리정제하는 단계를 포함하여 이루어지는 상기 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 및 그 알카리 및 알카리토금속염의 분리정제 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 불순물 제거단계가 에틸아세테이트 분획물을 실리카-겔 흡착 컬럼 크로마토그래피를 이용한 혼산:에틸아세테이트:메탄올 용매 7:7:1의 성분으로 불순물을 제거하고, 메탄올을 이용하여 실리카-겔 흡착 컬럼 크로마토그래피로부터 페로몬 유도체를 용출시키는 것을 특징으로 하는 분리정제 방법.

청구항 8.

제6항 또는 제7항에 있어서, 메탄올로 용출된 부분 정제상태의 페로몬 유도체를 아민 잔기가 결합되어 있는 아민컬럼이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 아이소-프로판올과 증류수를 이용한 기울기 용리법으로 페로몬 분획을 분리정제하는 것을 특징으로 하는 분리정제 방법.

청구항 9.

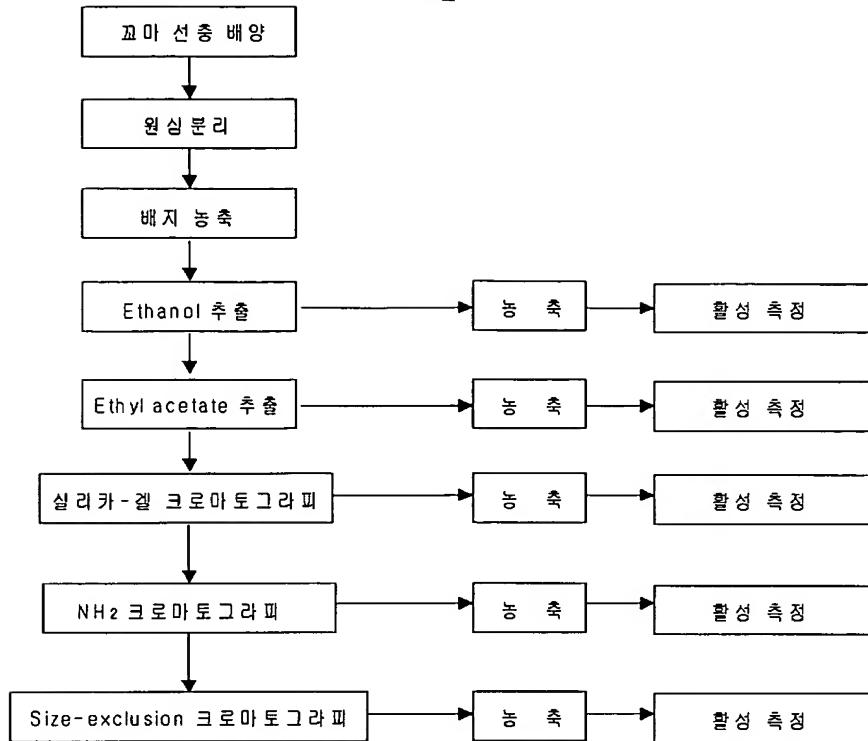
제6항 또는 제8항에 있어서, 얻어진 페로몬 활성분획을 분자량 크기별로 분리하는 컬럼(W251)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피로부터 메탄올 용매를 이용한 등용매 용리법으로 생리활성물질인 페로몬 유도체를 꼬마선충 및 유사종의 배양 배지로부터 분리하는 것을 특징으로 하는 분리정제 방법.

청구항 10.

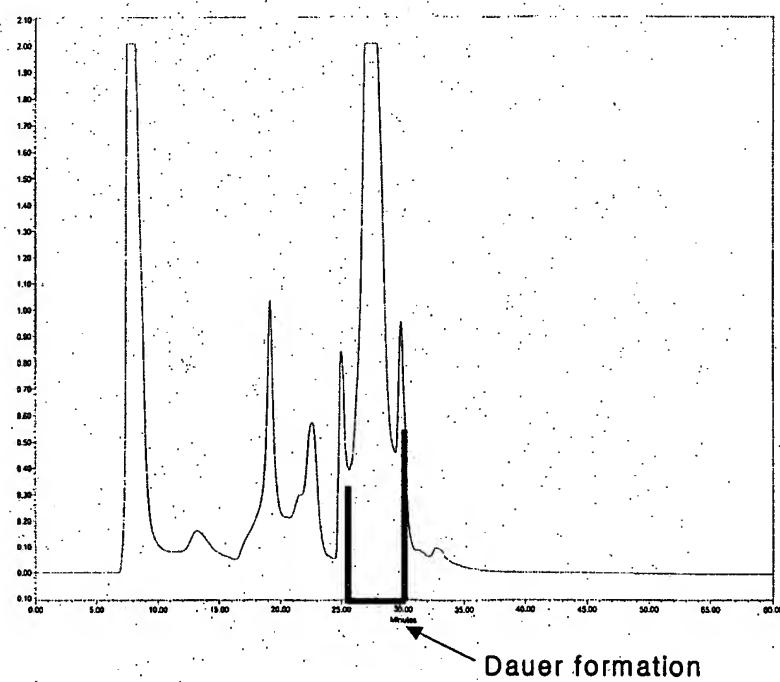
상기 화학식 I로 표시되는 페로몬 화합물 및 그 알카리 및 알카리토금속염을 노화 및 스트레스 관련 질환 조절제로 이용하는 용도.

도면

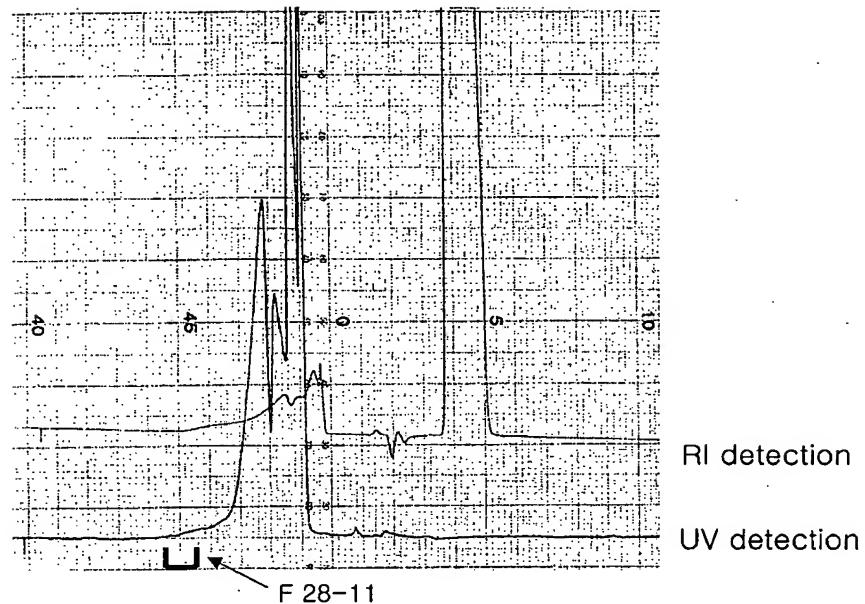
도면1



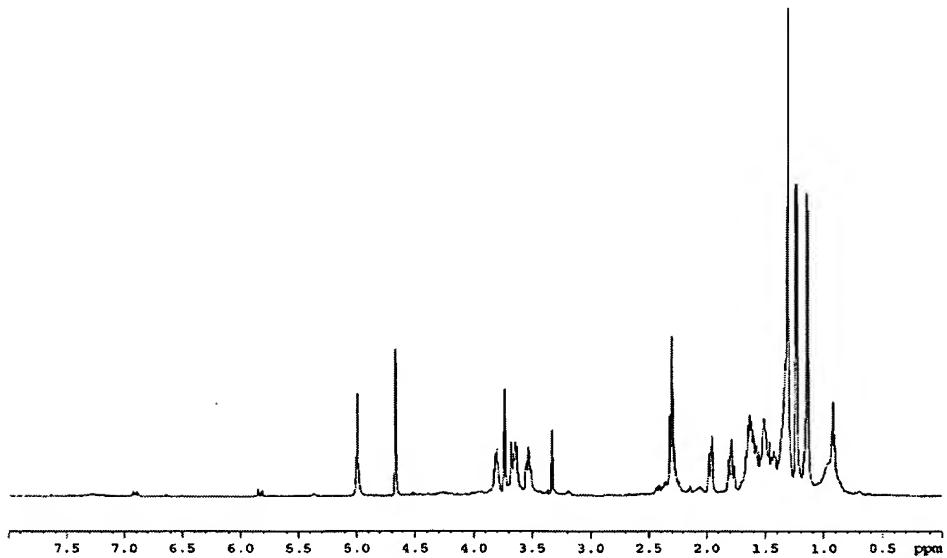
도면2



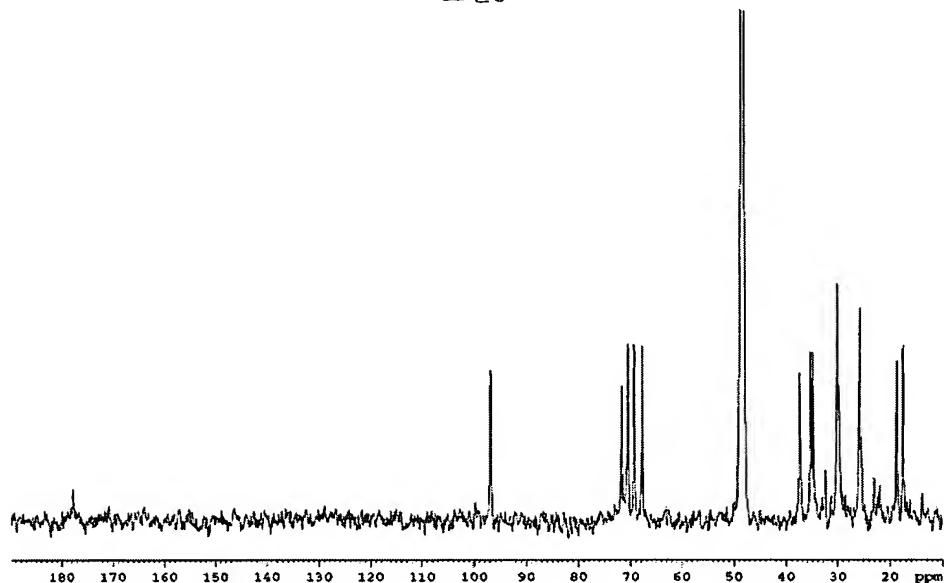
도면3



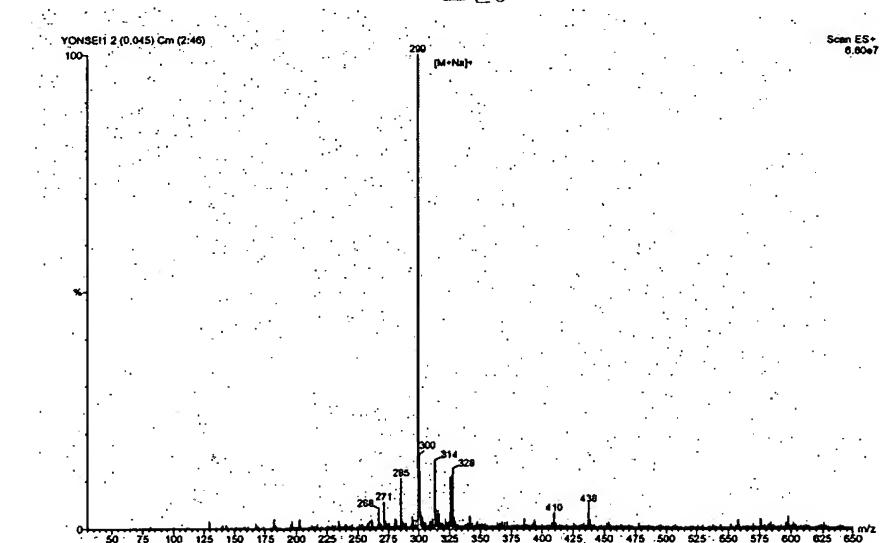
도면4



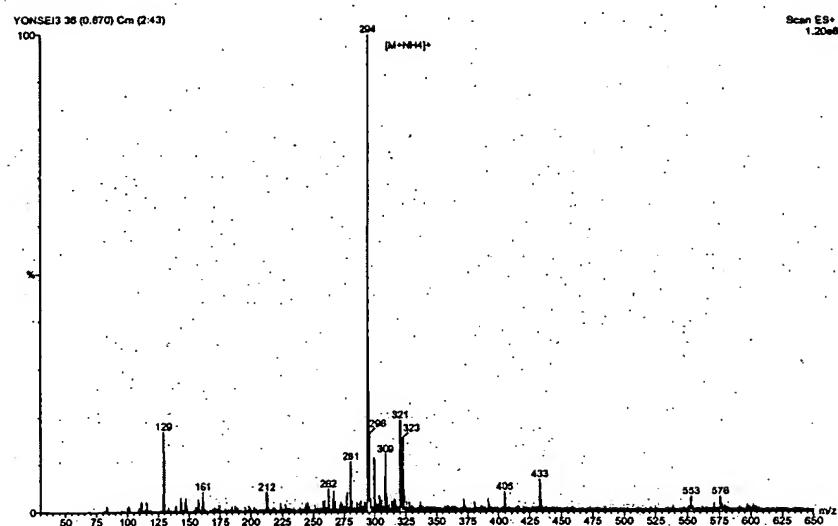
도면5



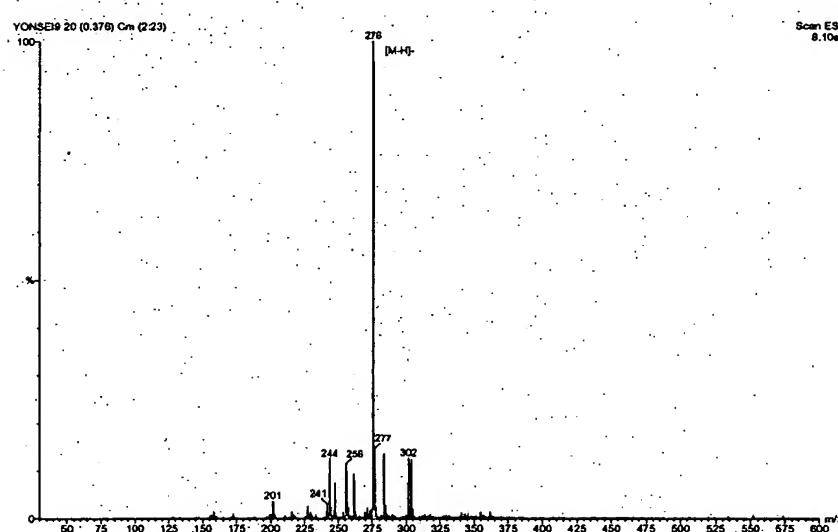
도면6



도면7



도면8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.